棉蚜 *AgosOBP5* 基因克隆、表达纯化及结合特性研究*

王铁矿[1**] 李峰奇[2] 刘思雨[1] 李增凤[3] 李秋荣[1***]

（1. 青海大学农林科学院，青海省农业有害生物综合治理重点实验室，农业农村部西宁作物有害生物科学观测实验站，西宁 810016；2. 贵州大学绿色农药全国重点实验室，精细化工研究开发中心，贵阳 550025；3. 都兰林晟防沙治沙有限责任公司，都兰 816100）

摘 要 **【目的】** 棉蚜 *Aphis gossypii* 是枸杞 *Lycium chinense*、棉花 *Gossypium herbaceum* 等作物上的一种成灾性害虫。明确气味结合蛋白与气味分子的结合特征及其在棉蚜嗅觉识别过程中发挥的作用，可为今后利用化学挥发物制作诱芯防治棉蚜提供理论依据。**【方法】** 基于转录组数据对棉蚜气味结合蛋白（OBPs）*AgosOBP5* 基因进行全长克隆并开展生物信息学分析；构建原核表达载体并用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测；利用荧光竞争结合实验研究 AgosOBP5 重组蛋白与水杨酸甲酯、苯乙醇、苄醇、壬醛、1-辛烯-3-醇、棕榈酸这 6 种植物源气味分子的结合特征。**【结果】** 棉蚜 *AgosOBP5* 基因全长为 675 bp，编码 224 个氨基酸，含有 12 个保守半胱氨酸，预测理论相对分子量为 54.50 kD。序列比对和系统进化树分析表明，棉蚜 AgosOBP5 氨基酸序列与大豆蚜 *Aphis glycines* AglyOBP5 同源性最高。经异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷（IPTG）诱导和 SDS-PAGE 检测，证明了 AgosOBP5 重组蛋白是可溶性蛋白，能够在上清液中表达。6 种气味分子均可将 AgosOBP5 与 N-苯基-1-萘胺（1-NPN）荧光探针体系的荧光强度值降到 50%以下，不同的是水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇、壬醛、1-辛烯-3-醇这 5 种化合物从初始滴加，荧光值即开始下降，随后一直保持不断下降的趋势，而棕榈酸在浓度低于 96 μmol·L^{-1}时荧光值呈升高趋势，随自身浓度不断升高后转为下降趋势。**【结论】** 本研究明确了棉蚜 *AgosOBP5* 基因的核苷酸及其编码氨基酸序列，根据 AgosOBP5 与植物源挥发物水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇、壬醛、1-辛烯-3-醇的良好结合能力，推断 AgosOBP5 蛋白可能在棉蚜的嗅觉信息识别中起着重要的作用。

关键词 棉蚜；气味结合蛋白；基因克隆；表达纯化；荧光竞争结合

Cloning, expression, purification and binding characteristics of the *AgosOBP5* gene in *Aphis gossypii*

WANG Tie-Kuang[1**] LI Feng-Qi[2] LIU Si-Yu[1] LI Zeng-Feng[3] LI Qiu-Rong[1***]

(1. Agriculture and Forestry Science Academy of Qinghai University, Provincial Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management, Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Xining, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xining 810016, China; 2. National Key Laboratory of Green Pesticide, Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Center for R&D of Fine Chemicals of Guizhou University, Guizhou 550025, China; 3. Dulan Linsheng Sand Prevention and Control Co., Ltd, Dulan 816100, China)

Abstract **[Aim]** *Aphis gossypii* is a serious pest of the Chinese wolfberry, cotton and other crops. The aim of this study was to identify the binding characteristics of odorant-binding proteins with odor molecules and establish their role in the olfactory recognition process in *A. gossypii*. The findings will establish a theoretical basis for using chemical volatiles in developing lures aimed at the future prevention and control of *A. gossypii*. **[Methods]** Using transcriptome data, a full-length sequence of the odorant-binding proteins (OBPs) *AgosOBP5* gene was obtained and bioinformatics analysis was performed.

*资助项目 Supported projects：海西州重点研发与转化计划（2023-YZ-Q02）；青海省昆仑英才·乡村振兴人才项目

**第一作者 First author，E-mail：3083253186@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：liqiurongkk@163.com

收稿日期 Received：2023-06-16；接受日期 Accepted：2023-11-30

The prokaryotic expression of *AgosOBP5* was constructed and detected by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Fluorescence competitive binding experiment was used to study the binding characteristics of the AgosOBP5 recombinant protein with six different odor molecules derived from plants. **[Results]** The total length of the *A. gossypii* gene *AgosOBP5* was 675 bp, encoding 224 amino acids, including 12 conserved cysteines. The predicted theoretical relative molecular weight was 54.50 kD. Sequence alignment and phylogenetic tree analysis show that the amino acid sequence of AgosOBP5 in *A. gossypii* has the highest homology with the AglyOBP5 in soybean aphid *A. glycines*. By Isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) induction and SDS-PAGE detection, it demonstrates that the recombinant protein AgosOBP5 is soluble and can be expressed in the supernatant. The test results show that these six odor molecules can reduce the fluorescence intensity value of the AgosOBP5 and N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) fluorescent probe system to less than 50%. Starting from the initial dropwise addition of the five compounds including methyl salicylate, 2-phenylethanol, benzyl alcohol, nonanal, and 1-octen-3-ol, the fluorescence value began to decrease and continued to maintain a downward trend. However, palmitic acid initially showed an increasing trend at the concentrations below 96 μmol·L^{-1}, this trend reversed later and showed a continuous decrease at other higher concentrations. **[Conclusion]** This study identified the nucleotide and amino acid sequences of protein encoded by *AgosOBP5* in *A. gossypii*. The protein AgosOBP5 has a higher binding affinity with methyl salicylate, 2-phenylethanol, benzyl alcohol, nonanal, and 1-octen-3-ol the five kinds of green leaf volatiles. It is inferred that AgosOBP5 protein may play an important role in the ordor information recognition of *A. gossypii*.

Key words *Aphis gossypii*; odorant-binding proteins; gene cloning; expression and purification; fluorescence competitive binding

枸杞 *Lycium chinense* 在中国栽培历史悠久、经济效益十分明显，是我国特有的一种经济作物（周静怡, 2022）。其药用保健价值高，含有人体所需的各种氨基酸及微量元素。长期食用能显著降低血液中的血糖、胆固醇和甘油三酯水平，预防高血糖及高血脂，是老少皆宜的保健食品（周媛媛, 2013）。随着中国西部大开发的不断推进，青海省枸杞产业获得大力发展，青海枸杞在我国枸杞产业体系中有着愈发重要的地位（张玉荣, 2021）。然而，近年来病虫害对青海枸杞的危害越来越严重，每年因病虫害造成枸杞产量和质量的损失也愈发严重。

棉蚜 *Aphis gossypii* 别名瓜蚜，在全世界广泛分布，可刺吸茄科、葫芦科等多种植物（吴文君等, 2020）。由于棉蚜长期危害枸杞，形成了与棉花等其他寄主植物上棉蚜不同的形态特征、生态参数、生活史特征及遗传特性等，分化成了寄主专化型棉蚜，称为枸杞型棉蚜（亦称枸杞棉蚜）（严林等, 2017）。枸杞棉蚜繁殖速度快，世代重叠严重，聚集在寄主植物嫩叶背面、果实、果柄以及嫩梢刺吸汁液，导致叶片被其分泌的蜜露包被，果皮干瘪，只剩下种子，严重影响枸杞产量和质量（杜玉宁等, 2007; 王娟, 2016）。虽然化学农药对枸杞棉蚜杀伤力强，但由于种植农户长期使用化学农药，棉蚜对这些农药产生了明显的抗药性，导致用药量不断增加，农药残留超标成为制约枸杞出口创汇的主要因素，更应引起注意的是枸杞果实农药残留极大地影响了食用者的身体健康。此外，化学农药的常年大量使用，导致非靶标生物如害虫天敌的大量减少，严重破坏了枸杞种植区域的生态平衡（谢谷艾, 2021）。因此，如何持续、安全、有效地控制枸杞棉蚜是枸杞安全生产的关键问题。

蚜虫具备远距离识别并寻找宿主植物的能力，这与其灵敏的嗅觉感受器对寄主植物气味信息物质的精确识别及信号传导密不可分（Thorsteinson, 1955）。枸杞棉蚜个体小、繁殖快，利用天敌等生物防治方法很难有效控制其危害且成本较高，而施用杀虫剂还会不可避免地伤害天敌。“反向化学生态”是替代化学防治的理想方案之一，通过研究害虫的嗅觉基因功能，找到对其有吸引作用的化合物，制备诱芯以实现绿色防控（杨贵琴, 2021）。气味结合蛋白（Odorant-binding proteins, OBPs）直接参与嗅觉感受器与外界气味分子发生的化学反应（刘靖涛, 2022），可选择性地结合气味分子，使昆虫触角能识别不同的气味。因此，了解枸杞棉蚜 OBPs 的特性及其与气味分子的交互作用，对了解枸杞

棉蚜与寄主植物间的通讯关系以及开发引诱剂或驱避剂具有重要意义。目前，已有研究报道了豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*（Zhou *et al*., 2010）、大豆蚜 *Aphis glycines*（杜永均等, 1994）、棉蚜（Pospisil, 1972）、麦长管蚜 *Sitobion avenae*（钟涛, 2008）、黑豆蚜 *Aphis fabae*（Alikhan, 1960; Nottingham *et al*., 1991）、胡秃子隐瘤蚜 *Cryptomyzus korschelti*（Visser and Taanman, 1987）、忽布瘤额蚜 *Phorodon humuli*（Campbell *et al*., 1990）等对寄主和非寄主植物气味的行为反应以及部分蚜虫 OBPs 基因的功能。然而，关于枸杞的化学挥发物组分、棉蚜的行为特性与枸杞的化学挥发物之间的关系，以及棉蚜如何确定气味分子信息源的机制尚不明确。

为探明 OBPs 在棉蚜识别寄主植物气味过程中的作用，本研究通过对枸杞棉蚜进行转录组测序，获得了 *AgosOBP5* 基因的片段序列，设计引物克隆得到该基因的编码序列（Encoding Sequence，CDS），以大肠杆菌 *Escherichia coli* 为载体进行表达，获得纯化的重组蛋白，并利用荧光竞争结合实验测定纯化后的蛋白与寄主植物枸杞 6 种挥发物的结合能力，从而探讨 *AgosOBP5* 的生理生化功能，为今后探究棉蚜与枸杞间的可能通讯机制奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材料和实验仪器

供试虫源：棉蚜为青海大学温室大棚枸杞植株上的种群，室温和自然光照条件下饲养。

主要试剂：质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒、T4 连接酶、pMD18-T、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、DH5α 感受态细胞均购于南京诺唯赞生物科技有限公司；三羟甲基氨基甲烷（Trometamol，Tris）、壬醛、苯乙醇、棕榈酸、水杨酸甲酯、苯甲醇、蘑菇醇购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司；氯化钠、氨苄青霉素钠、硫酸卡那霉素、蛋白胨、琼脂糖、酵母提取粉购于上海吉至生化科技有限公司。

实验仪器：电热恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司；高速冷冻离心机，湘仪离心机仪器有限公司；蠕动泵，重庆杰恒蠕动泵有限公司；不锈钢立式灭菌器，合肥华泰医疗设备有限公司；超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；恒温摇床，上海知楚仪器有限公司；超声破碎仪，宁波新芝生物科技股份有限公司；荧光分光光度计，安捷伦科技有限公司。

引物合成：根据基因序列的开放阅读框（Open reading frame，ORF），利用 Primer Premier 5.5 软件设计引物（表 1），由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2　实验方法

1.2.1　总 RNA 的提取及 cDNA 的合成　本实验样品设 3 个重复，每个重复包括 50 头棉蚜。根据 RNA 提取试剂盒操作说明书，将棉蚜在液氮中速冻，充分研磨成粉末后放入离心管中；加入 1 mL RNAiso Reagent 并振荡混匀，在室温下放置 10 min；快速向离心管中加入 200 μL 氯仿，用枪头吹打混匀，使溶液呈现乳白色无分层，在室温下放置 5 min；将离心管放置于 4 ℃，12 000 r/min 的条件下离心 10 min，收集上清至新的离心管中；向离心管内加入等体积异丙醇，用枪头吹打均匀，在室温下放置 15 min；4 ℃，12 000 r/min 离心 10 min，遗弃上清保留沉淀；用 75%乙醇清洗沉淀，4 ℃，12 000 r/min 离心 5 min，吸出乙醇溶液；再用 75%的乙醇清洗一次，将沉淀在室温下干燥约 8 min，加入超纯水使沉淀溶解，放在 - 80 ℃超低温冰箱中保存；使用 cDNA 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链备用。

表 1　枸杞棉蚜 *AgosOBP5* 基因的引物

Table 1　Primers for the *AgosOBP5* gene in *Aphis gossypii*

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences (5′-3′)	引物用途 Primer usage
OBP5LP	ATGAAAATGTCCGCTAACGGTG	cDNA 扩增 cDNA amplification
OBP5RP	TCATTGGTTTGATGGTGATTTTTGC	cDNA 扩增 cDNA amplification

1.2.2 棉蚜气味结合蛋白 AgosOBP5 全长 cDNA 序列克隆及重组质粒构建 以反转录合成的 cDNA 为模板，PCR 扩增获得棉蚜 *AgosOBP5* 基因的开放阅读框全长。反应条件：98 ℃预变性 2 min；98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃彻底延伸 5 min。PCR 产物胶回收，微量核酸检测仪检测浓度，之后连接到 pMD18-T 载体，进行 DH5α 感受态细胞转化，挑选单个菌落进行菌液 PCR，1%琼脂糖凝胶电泳跑胶验证，最后将验证的阳性菌液送到生工生物工程（上海）股份有限公司进行双向测序。将公司返回的正确质粒进行双酶切，用 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中，涂板过夜培养，挑选单个阳性菌落进行菌液 PCR，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序，验证成功后用于原核表达。

1.2.3 序列分析及系统发育树构建 采用软件 DNAMAN 6.0 对枸杞棉蚜基因 *AgosOBP5* 所编码的蛋白质氨基酸序列进行分析，用 MEGA 7.0 软件采用邻接法（1 000 次）构建系统发育树。

1.2.4 重组蛋白表达及纯化 在 Luria-Bertani（LB）液体培养基中加入含有基因重组的质粒，37 ℃振荡培养，再将菌液分为两组，其中，一组作为空白对照，另一组中加入 IPTG，37 ℃培养 4 h，分别从两组液体中取出 0.2 mL，12 000 r/min 离心 2 min，离心后倒去上清液，将菌液沉淀用电泳缓冲液使其裂解，最后用 SDS-PAGE 进行检测。

重组蛋白正确表达后，取 1 000 mL 的 LB 液体培养基，接种 50 mL 的菌液，37 ℃振荡培养使 OD_{600} 达到 0.6，滴加 IPTG 诱导剂使最终的浓度为 0.1 mmol·L^{-1}，16 ℃继续培养 12 h，将培养基于 8 000 r/min 条件下离心 3 min 后取沉淀，将沉淀放置于次氮基三乙酸（Nitrilotriacetic acid，NTA-0）缓冲液里，冰浴 30 min。取沉淀于超声破碎器中将菌体打碎后，以 16 000 r/min 4 ℃离心 1 h，分别收集上清和沉淀，进行 SDS-PAGE 检测。

纯化蛋白：用 0.22 μm 孔径的过滤器过滤上一步得到的上清液，将上清液放入 Ni-NTA 柱中，设置其流速 1 mL/min，用 NTA-0 缓冲液多次洗柱，直至流出的溶液中没有蛋白，再用咪唑洗脱直到 G250 染料的颜色不再变化，将最终得到的洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 AgosOBP5 蛋白的荧光竞争结合实验 采用荧光竞争结合实验测定 AgosOBP5 与不同气味分子的结合能力。本研究从人工栽培枸杞品种（柴杞 3 号）所检测到的化学挥发物中选择了 6 种，用于开展荧光竞争结合实验，这 6 种化合物分别为：水杨酸甲酯（A）、2-苯乙醇（B）、苄醇（C）、壬醛（D）、1-辛烯-3-醇（E）和棕榈酸（F），包括酯类、醇类、醛类和酸类，其中，A、B 和 C 为含苯环的芳香族化合物，D 为脂肪族饱和醛，E 为脂肪族不饱和醇，F 为脂肪族饱和酸，A、B、C、D 和 F 在柴杞 3 号叶片、花、青果和红果中均检测到，E 仅在花和青果中检测到。具体步骤如下：用 20 mmol·L^{-1} 的 Tris-HCl 缓冲液（pH 7.4）将 AgosOBP5 蛋白样品稀释至 2 μmol·L^{-1}，用色谱级甲醇将 1-NPN 溶解后稀释至 1 mmol·L^{-1}，作为探针的储存液。向终浓度为 2 μmol·L^{-1} 的 AgosOBP5 蛋白溶液中逐次滴定 1-NPN 探针溶液，使 1-NPN 终浓度分别达到 2、4、6、8、10、12、14、16、18 和 20 μmol·L^{-1}，每次浓度滴定，荧光分光光度计会自动记录 337 nm 光激发后混合溶液在 350-600 nm 之间的所有荧光光强度的变化数据。绘制以荧光值为纵坐标，以相应的波长为横坐标的曲线图，从中获得对应的光波长和荧光值，并计算 1-NPN 与 AgosOBP5 的解离常数 $K_{1\text{-NPN}}$。

利用荧光竞争结合法测定 AgosOBP5 蛋白与各种气味分子之间的结合能力。向比色皿中加入用 20 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 7.4）稀释的终浓度为 2 μmol·L^{-1} 的 AgosOBP5 蛋白溶液，再加入 1-NPN 使终浓度为 2 μmol·L^{-1}，记录光强度变化。分别用 1 mmol·L^{-1} 的气味标样和蛋白进行结合，调整气味标样的浓度至 16、32、64、96 和 112 μmol·L^{-1}，记录所有浓度变化下的荧光值，分别设置 3 个重复组，到荧光强度减小至初始值的一半时，记录气味分子浓度 IC_{50}。

1.3　数据处理

将荧光竞争结合法测定 AgosOBP5 蛋白与各种气味分子之间的结合能力的实验数据输入 Graphpad Prism 8.0.2 软件分析结果，根据 IC_{50} 与 $K_{1\text{-}NPN}$ 计算气味化合物与 AgosOBP5 蛋白的结合常数（K_i），公式为 $K_i=IC_{50}/[1+(1\text{-}NPN)/K_{1\text{-}NPN}]$，其中，1-NPN 为该气味浓度时游离的 1-NPN 的浓度，$K_{1\text{-}NPN}$ 为 1-NPN 与 AgosOBP5 的解离常数。解离常数越小，表示结合能力越强。

荧光竞争结合实验数据使用 Graphpad Prism 8.0.2 软件中适合一个结合位点的经典方程，对每次滴加的 1-NPN 终浓度和其对应的最大荧光值数据进行非线性回归拟合分析，并采用 Scatchard 方程做线性化拟合验证，计算出气味结合蛋白 AgosOBP5 与 1-NPN 探针的解离常数。

2　结果与分析

2.1　棉蚜 *AgosOBP5* 基因 cDNA 克隆和序列分析

以棉蚜成虫 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增得到特异性条带，经测序获知泳道标号“5”的条带大小为 675 bp（图 1）。通过菌落 PCR 进行鉴定，确定为阳性克隆（图 2）。将阳性克隆进

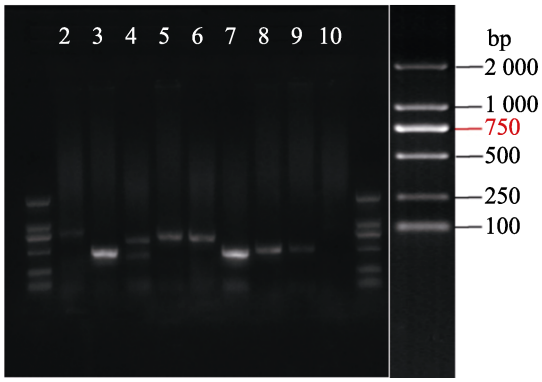

图 1　枸杞棉蚜气味结合蛋白基因扩增

Fig. 1　Amplification of odor binding protein of *Aphis gossypii*

泳道 2-10 分别为 *AgosOBP2*、*AgosOBP3*、*AgosOBP4*、*AgosOBP5*、*AgosOBP6*、*AgosOBP7*、*AgosOBP8*、*AgosOBP9* 和 *AgosOBP10*。

Lane 2-10 are *AgosOBP2*, *AgosOBP3*, *AgosOBP4*, *AgosOBP5*, *AgosOBP6*, *AgosOBP7*, *AgosOBP8*, *AgosOBP9* and *AgosOBP10*, respectively.

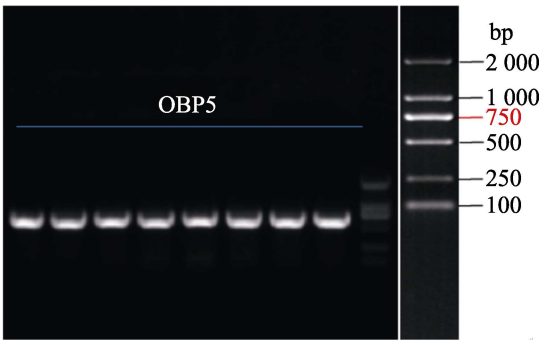

图 2　OBP5 菌落 PCR 鉴定阳性克隆

Fig. 2　Identification of OBP5 colony PCR positive clones

行测序，确定泳道“5”与转录组测序结果 *AgosOBP5* 序列一致，在 NCBI 数据库进行序列分析比对，进一步确定该条带为 *AgosOBP5* 基因。测序结果显示，枸杞棉蚜 *AgosOBP5* 基因 cDNA 全长为 675 bp，编码 224 个氨基酸，含有 12 个保守半胱氨酸，预测理论相对分子量为 54.50 kD。AgosOBP5 蛋白由 23 种氨基酸组成，其中，赖氨酸和丙氨酸含量最高，组氨酸和色氨酸含量最低（图 3）。

2.2　系统发育进化树分析

利用枸杞棉蚜 AgosOBP5 的氨基酸序列与其他已知近缘种昆虫气味结合蛋白构建系统发育树，系统进化树分析结果显示，枸杞棉蚜 *AgosOBP5* 与花生蚜 *Aphis craccivora*、大豆蚜 OBP5 聚为一支，亲缘关系最近，棉蚜与花生蚜、大豆蚜的序列一致性均达 98.6%以上。此外，系统发育树分析结果表明棉蚜与多种昆虫的 OBP5 聚为一簇，且其氨基酸序列一致性均大于 50%（图 4）。

2.3　重组蛋白 AgosOBP5-Pcold-sumo 的表达及纯化

采用抗性筛选法筛选重组的阳性克隆。通过氨苄青霉素的抗性筛选获得阳性克隆，并进行质粒测序，获得目的蛋白的基因序列与枸杞棉蚜 *AgosOBP5* 基因序列一致；AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD 阳性克隆经少量表达后进行 SDS-PAGE 检测，可见差异条带（图 5），说明 AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD 重组蛋白基因经

```
atgaaaatgtccgctaacggtgcaacgatgaaatgcgtcgcagttgccgtcgtcctgttt
 M  K  M  S  A  N  G  A  T  M  K  C  V  A  V  A  V  V  L  F
cagatgtccgtcattttcgcggaagcgggtcaccaaagacggggcaaagaactgttggac
 Q  M  S  V  I  F  A  E  A  G  H  Q  R  R  G  K  E  L  L  D
acagaagacagcgacttctttcggtgcaaacaagccagcaggaagtcatgttgtggcccg
 T  E  D  S  D  F  F  R  C  K  Q  A  S  R  K  S  C  C  G  P
gaaaacgcaatgaagcgatttggcgataaagacaaagtagcagctgacgagtgttacgca
 E  N  A  M  K  R  F  G  D  K  D  K  V  A  A  D  E  C  Y  A
caagtagccgaaaagtttgcaacagttacagctactacacccaaacaagacttgttttcc
 Q  V  A  E  K  F  A  T  V  T  A  T  T  P  K  Q  D  L  F  S
ggcgaagctgtaaagattaccaagaaaaagcaattctgccttcatgaatgtatcggaaag
 G  E  A  V  K  I  T  K  K  K  Q  F  C  L  H  E  C  I  G  K
aaaaacaaattgctcaccgaagacggttcactgaacaaaacgtttatagctgattacgct
 K  N  K  L  L  T  E  D  G  S  L  N  K  T  F  I  A  D  Y  A
atgaagagcgtcttcaaagaacagtggcagaaacaaataggacaaaaagccttggacaaa
 M  K  S  V  F  K  E  Q  W  Q  K  Q  I  G  Q  K  A  L  D  K
tgcctggaggagacctacatcccatggccggcagaagaaacagaaaacaaatgcaatcca
 C  L  E  E  T  Y  I  P  W  P  A  E  E  T  E  N  K  C  N  P
gtatacgtacaattccaacactgtctgtggcttgaatacgaatcgaactgtccagataac
 V  Y  V  Q  F  Q  H  C  L  W  L  E  Y  E  S  N  C  P  D  N
aagattaagctcaccaaaaaatgcgagaagacacgaaaccgatacaggatgcaaaaatca
 K  I  K  L  T  K  K  C  E  K  T  R  N  R  Y  R  M  Q  K  S
ccatcaaaccaatga
 P  S  N  Q  -
```

图 3　枸杞棉蚜 *AgosOBP5* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3　*AgosOBP5* nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Aphis gossypii*

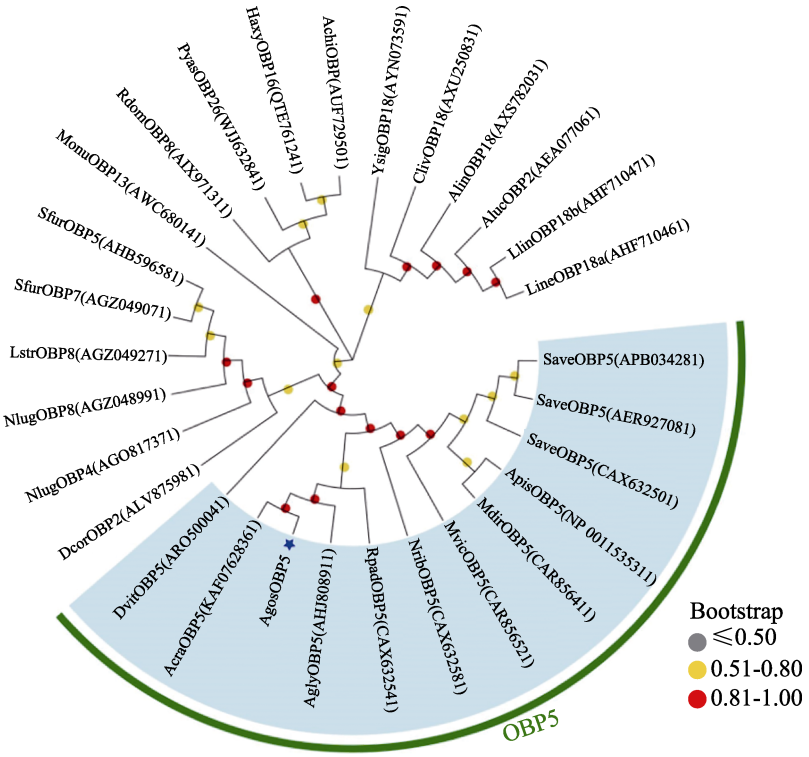

图 4　基于枸杞棉蚜 AgosOBP5 氨基酸序列构建的昆虫 OBPs 进化树

Fig. 4　Evolutionary tree of insects' OBPs constructed based on AgosOBP5 amino acid sequence

通过 MEGA 7.0 软件采用邻接法引导重复 1 000 次作图。Agos：棉蚜；Acra：花生蚜；Apis：豌豆蚜；Save：麦长管蚜；Mvic：巢菜修尾蚜；Rpad：禾谷溢管蚜；Mdir：麦无网长管蚜；Nrib：醋栗生菜蚜；Agly：大豆蚜；Dvit：根瘤蚜；Sfur：白背飞虱；Nlug：褐飞虱；Lstr：灰飞虱；Monu：茶小绿叶蝉；Alin：棉盲蝽；Haxy：异色瓢虫；Llin：牧草盲蝽；Aluc：绿盲蝽；Cliv：黑肩绿盔盲蝽；Ysig：锤胁跷蝽；Pyas：枣食蚜象甲；Rdom：谷蠹。

The mapping was repeated 1 000 times by mega 7.0 software with adjacency method. Agos: *Aphis gossypii*; Acra: *Aphis craccivora*; Apis: *Acyrthosiphon pisum*; Save: *Sitobion avenae*; Mvic: *Megoura viciae*; Rpad: *Rhopalosiphum padi*; Mdir: *Metopolophium dirhodum*; Nrib: *Nasonovia ribisnigri*; Agly: *Aphis glycines*; Dvit: *Daktulosphaira vitifoliae*; Sfur: *Sogatella furcifera*; Nlug: *Nilaparvata lugens*; Lstr: *Laodelphax striatellus*; Monu: *Matsumurasca onukii*; Alin: *Adelphocoris lineolatus*; Haxy: *Harmonia axyridis*; Llin: *Lygus lineolaris*; Aluc: *Apolygus lucorum*; Cliv: *Cyrtorhinus lividipennis*; Ysig: *Yemma signatus*; Pyas: *Pachyrhinus yasumatsui*; Rdom: *Rhyzopertha dominica*.

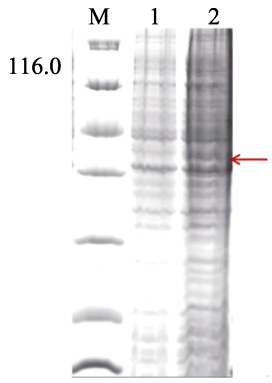

图 5　阳性菌株全菌蛋白的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 5　SDS-PAGE electrophoretogram of whole bacterial protein of positive strains

箭头所指为重组蛋白；泳道 M：蛋白分子量标准（116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4 和 14.4 kD）；泳道 1：宿主菌全菌蛋白；泳道 2：AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD IPTG 诱导全菌蛋白。
The arrows indicate recombinant protein; Lane M: Protein ladders (116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 and 14.4 kD); Lane1: Host bacteria whole bacterial protein; Lane 2: AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD IPTG induce whole bacterial protein.

IPTG 诱导后可在大肠杆菌表达系统中表达。筛选到的重组阳性克隆经放大培养与超声波破碎，获得的重组蛋白包含 His sumo tag 标签（~16 kD）。通过 SDS-PAGE 检测，AgosOBP5-Pcold-sumo 重组蛋白分子量约为 38 kD（图 6），大小符合目的蛋白分子量预期。

AgosOBP5-Pcold-sumo 在大量表达后获得的重组蛋白证明了该蛋白可以用 Ni-NTA 纯化技术过柱层析纯化。将 AgosOBP5-Pcold-sumo 表达的重组蛋白用 0.22 μm 孔径的过滤器过滤获得上清液，上清经 Ni-NTA 纯化技术纯化得到重组蛋白 2 mg，重组蛋白纯度为 85%，SDS-PAGE 电泳验证纯化后的重组蛋白条带与预期相符，是目的条带（图 7）。

2.4　AgosOBP5 蛋白的荧光竞争结合实验

本实验选择 1-NPN 作为探针。当使用波长为 337 nm 的激发光穿过比色皿中的 AgosOBP5 蛋白溶液时，图 8 显示在 406 nm 处对应的荧光强度最大。因此，设定发射光波长为 406 nm，对每次滴加的 1-NPN 终浓度与混合液产生的荧光值进行非线性回归拟合分析，进一步利用 Scatchard 方程作线性化拟合验证，计算得到

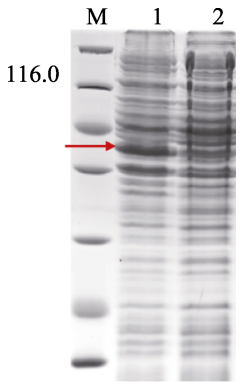

图 6　菌体破碎上清及沉淀 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 6　SDS-PAGE electrophoresis map bacterial fragmentation supernatant and precipitation

箭头所指为重组蛋白。泳道 M：蛋白分子量标准（116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4 和 14.4 kD）；泳道 1：AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD 诱导表达破碎后的上清蛋白；泳道 2：AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD 诱导表达破碎后的不溶蛋白。
The arrows indicate recombinant proteins. Lane M: Protein ladder (116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 and 14.4 kD); Lane 1: AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD induce expression of fragmented supernatant; Lane 2: AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD induce expression of insoluble proteins after fragmentation.

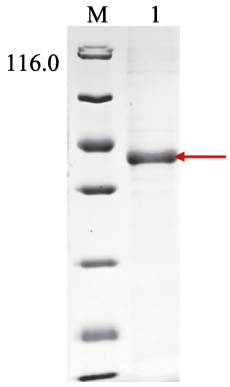

图 7　洗脱蛋白的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 7　SDS-PAGE Electrophoretogram of elution proteins

箭头所指为重组蛋白泳道。M：蛋白分子量标准（116.0、66.2、45.0、35.0、25.0、18.4 和 14.4 kD）；泳道 1：AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD 洗脱蛋白。
The red arrows indicate recombinant proteins. Lane M: Protein ladders (116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 and 14.4 kD) ; Lane 1: AgosOBP5-Pcold-sumo 38 kD elution proteins.

AgosOBP5 与 1-NPN 的结合解离常数 $K_{1\text{-}NPN}$= 18.96 μmol·L^{-1}（图 8）。6 种挥发物的结合曲线见图 9（A-F），实验结果表明，6 种气味分子水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇、壬醛、1-辛烯-3-醇和棕榈酸均可将 AgosOBP5/1-NPN 体系的荧光强度值降到 50%以下，不同的是水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇、壬醛、1-辛烯-3-醇这 5 种化合物从初始滴加，荧光值即开始下降，随后一直保持不断下降的趋势，而棕榈酸在浓度低于 96 μmol·L^{-1} 时呈升高趋势，后随自身浓度不断升高转为下降趋势，但其竞争结合的荧光值仅下降至最大荧光值的 77.3%，因此，AgosOBP5 与棕榈酸属于弱结合。6 种气味分子的解离常数分别为（0.046±0.004）、（0.053±0.004）、（0.046±0.005）、（0.063±0.007）、（0.142±0.02）μmol·L^{-1} 和未知。水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇、壬醛和 1-辛烯-3-醇均可与 AgosOBP5 结合，且亲和度均较强，尤其是水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇和壬醛的亲和度最强，在竞争测定的 6 种气味分子中，枸杞棉蚜 AgosOBP5 与 3 种芳香族化合物水杨酸甲酯、2-苯乙醇和苄醇的亲和性最好，其次为脂肪族饱和醛壬醛，再者为脂肪族不饱和醇 1-辛烯-3-醇。棕榈酸与气味结合蛋白 AgosOBP5 的亲和性尚需进一步深入研究验证。

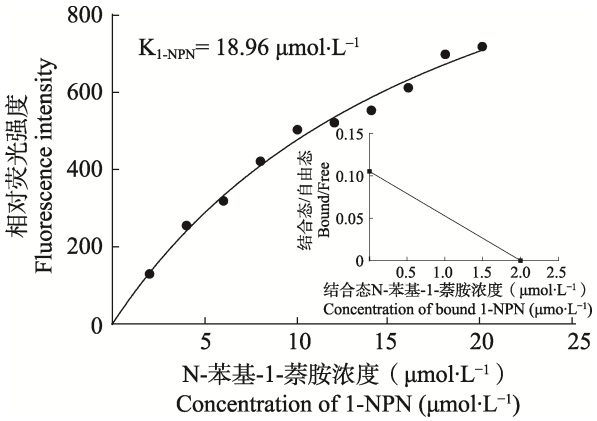

图 8　AgosOBP5 蛋白与 1-NPN 的结合曲线及线性化的斯卡查德图

Fig. 8　Binding curves and linear Scatchard plots of AgosOBP5 protein to 1-NPN

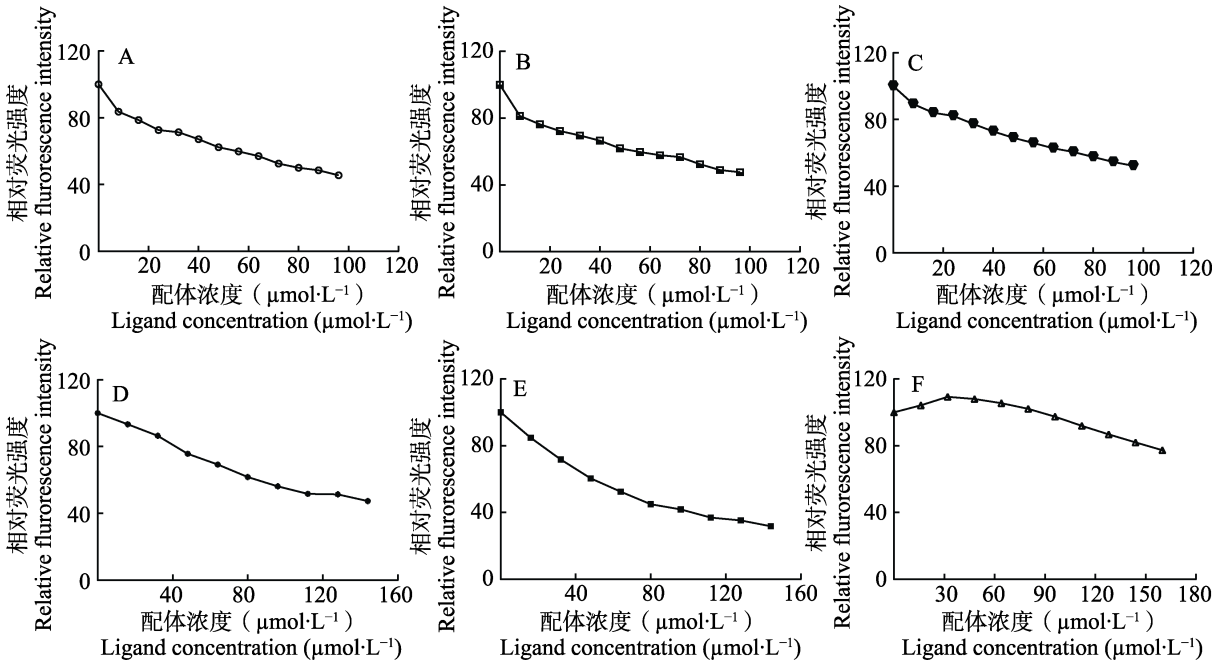

图 9　气味分子与 AgosOBP5 的结合曲线

Fig. 9　Binding curves of odorant molecules to AgosOBP5

A. 水杨酸甲酯；B. 苯乙醇；C. 苄醇；D. 壬醛；E. 1-辛烯-3-醇；F. 棕榈酸。图中的横坐标均为气味分子（配基）浓度，纵坐标为 AgosOBP5/1-NPN 体系产生的相对荧光强度。

A. Methyl salicylate; B. Phenylethanol; C. Benzyl alcohol; D. Nonyl aldehyde; E. 1-Octene-3-alcohol; F. Palmitic acid. The X-axis is the concentration of odorant molecules (ligands), and the Y-axis is the relative fluorescence intensity produced by the AgosOBP5/1-NPN system.

3　讨论

在昆虫漫长的进化过程中，形成了高度灵敏发达的嗅觉系统，它能够使昆虫区分所在区域内的微量气味分子，从而做出相应的生理行为（Robertson *et al*., 1999; Leal, 2013）。昆虫体内的嗅觉感受蛋白与环境中的气味分子相结合是昆虫可以感受到外界信号分子的主要原因（缪森等, 2003; 李卫华等, 2006; 黄恩炯等, 2008），也是昆虫嗅觉感受过程中的第一步生化反应（Vogt *et al*., 1999）。因此，OBPs 在昆虫寻找寄主、交配及产卵场所等行为选择及信息交换中具有十分重要的意义（刘靖涛, 2022）。

本研究主要对枸杞棉蚜的气味结合蛋白 AgosOBP5 进行了研究，根据转录组数据，克隆得到的 Agos*OBP5* 基因具有 OBPs 一族的共同特性，如分子量相对较小，与水的结合能力强等，这些都表明本研究克隆到的枸杞棉蚜 *AgosOBP5* 基因属于昆虫 OBPs 家族成员之一。通过氨基酸序列比对和系统进化树分析可以看出 AgosOBP5 与 OBPs 家族的其他序列同源性较高，其中，与花生蚜、大豆蚜的同源性最高。为了方便重组蛋白检测和蛋白纯化，在表达载体上加入 His sumo tag 标签，经过 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 电泳检测，证明了重组蛋白是可溶性蛋白，能够在上清液中表达，这与郭莉等（2023）、张国辉等（2023）在大肠杆菌中成功表达的 PstrOBP1 和 AzanOBP5 重组蛋白均为可溶性蛋白的结果一致。

年和粉等（2023）通过荧光竞争结合实验测定发现，梨小食心虫 *Grapholita molesta* 重组蛋白 GfunOBP2 对苹果树挥发化合物中的反-2-己烯-1-醇、己醛、α-罗勒烯和柠檬烯等 12 种具有强结合能力，表明 GfunOBP2 在识别寄主植物挥发化合物的过程中起着重要作用。本研究用体外荧光竞争结合实验来测定枸杞棉蚜 AgosOBP5 与 6 种气味分子的结合能力，发现 AgosOBP5 与 6 种气味分子中的 5 种即水杨酸甲酯、2-苯乙醇、苄醇、壬醛和 1-辛烯-3-醇都有良好的结合能力，且这 5 种绿叶气味与枸杞棉蚜重组蛋白 AgosOBP5 的竞争结合过程具有相近的变化趋势，而棕榈酸与 AgosOBP5 产生的相对荧光值却呈现出特殊的变化趋势。参考 Prestwich（1993）提出的 OBPs 是利用气味分子的碳链长度、官能团或者烯烃异构等结构信息对气味进行有效筛选和结合，推测相对荧光值的特殊变化趋势可能与棕榈酸的碳链长度、官能团类型或者空间结构有关。通过测定 AgosOBP5 蛋白与气味分子的结合特征，发现枸杞棉蚜的 AgosOBP5 是具有选择性的，推断该蛋白可能在蚜虫信息识别中起着重要作用。本研究筛选到与 AgosOBP5 有高亲和性的气味物质，可为今后研制棉蚜的行为干扰剂提供理论依据（He *et al*., 2019）。

大多数绿叶气味具有生物活性（Quiroz and Niemeyer, 1998），绿叶气味在昆虫识别和选择信号上发挥着重要作用，尤其是在昆虫选择各种寄主植物时（赵威, 2022）。气味结合蛋白 OBPs 是昆虫体内高度保守的蛋白质（Vandermoten *et al*., 2011），深入了解 OBPs 的性质和结构，并弄清 OBPs 与植物性挥发物质的结合特性，对研究 OBPs 基因的功能十分重要。本研究为探索枸杞棉蚜对寄主植物枸杞的挥发性物质的识别机制以及筛选防治枸杞棉蚜的引诱剂或驱避剂奠定了理论基础。

参考文献 (References)

Alikhan MA, 1960. The experimental study of the chemotactic basis of host-specificity in a phytophagous insect, *Aphis fabae* Scop. (Aphididae: Homoptera). *Annales Universitatis Mariae Curte-Sklodowska LublinSect*, 15: 117–157.

Campbell CA, Dawson GW, Griffiths DC, Pettersson J, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM, 1990. Sex attractant pheromone of damson-hop aphid *Phorodon humuli* (Homoptera, Aphididae). *Journal of Chemical Ecology*, 16(12): 3455–3465.

Du YJ, Yan FS, Han XL, Zhang GX, 1994. Olfaction in host plant selection of the soybean aphid *Aphis glycines*. *Acta Entomologica Sinica*, 37(4): 385–392. [杜永均, 严福顺, 韩心丽, 张广学, 1994. 大豆蚜嗅觉在选择寄主植物中的作用. 昆虫学报, 37(4): 385–392.]

Du YN, Zhang ZS, Shen RQ, Gao L, 2007. Indoor virulence determination of four biopesticides against *Aphis gossypii*. *Forestry Science and Technology*, 32(6) : 29–30. [杜玉宁, 张宗

山, 沈瑞清, 高丽, 2007. 四种生物农药对枸杞蚜虫的室内毒力测定. 林业科技, 32(6): 29–30.]

Guo L, Chen D, Jia RH, Gao XJ, Zhang ZT, Xie SA, Lü SJ, 2023. Cloning and expression of the odorant binding protein AzanOBP5 in pepper buprestid beetle *Agrilus zanthoxylumi*. *Journal of Plant Protection*, 50(1): 81–90. [郭莉, 陈迪, 贾任航, 高晓进, 张泽腾, 谢寿安, 吕淑杰, 2023. 花椒窄吉丁气味结合蛋白 AzanOBP5 的克隆与表达. 植物保护学报, 50(1): 81–90.]

He P, Chen GL, Li S, Wang J, Ma YF, Pan YF, He M, 2019. Evolution and functional analysis of odorant-binding proteins in three rice planthoppers: *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera*, and *Laodelphax striatellus*. *Pest Management Science*, 75(6): 1606–1620.

Huang EJ, Guo XX, Zhao TY, 2008. Advances on the olfactory mechanism of insect. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 15(2): 115–119. [黄恩炯, 郭晓霞, 赵彤言, 2008. 昆虫嗅觉反应机理的研究进展. 寄生虫与医学昆虫学报, 15(2): 115–119.]

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: Roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58: 373–391.

Li WH, Tu HT, Miao XX, Guo XR, 2006. Research progresses of proteins related with insect olfactory. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(6): 757–762. [李卫华, 涂洪涛, 苗雪霞, 郭线茹, 2006. 昆虫嗅觉相关蛋白的研究进展. 昆虫知识, 43(6): 757–762.]

Liu JT, 2022. Identification and functional analysis of olfactory related genes in green peach aphid (*Myzus persicae*). Doctor dissertation. Shenyang: Shenyang Agricultural University. [刘靖涛, 2022. 桃蚜嗅觉相关基因鉴定及功能分析. 博士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学.]

Miao S, Zhang L, Wang LH, 2003. Research progress of insect odor-binding proteins. *Journal Yunnan University* (*Natural Sciences Edition*), 25(S1): 161–165, 169. [缪森, 张龙, 王丽红, 2003. 昆虫气味结合蛋白研究进展. 云南大学学报(自然科学版), 25(S1): 161–165, 169.]

Nian HF, Zhang YX, Li BL, Chen XL, Luo K, Li GW, 2023. Expression and ligand binding characteristics of *GfunOBP2* from *Grapholita funebrana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 56(12): 2302–2316. [年和粉, 张钰析, 李伯辽, 陈秀琳, 罗坤, 李广伟, 2023. 李小食心虫 *GfunOBP2* 的原核表达及气味配体结合特性. 中国农业科学, 56(12): 2302–2316.]

Nottingham SF, Hardie J, Dawson GW, Hick AJ, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM, 1991. Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 17(6): 1231–1242.

Pospisil J, 1972. Olfactory orientation of certain polyphagous insects in Cuba. *Acta Entomologica Bohemoslov*, 69: 7–17.

Prestwich GD, 1993. Bacterial expression and photoaffinity labeling of a pheromone binding protein. *Protein Science*, 2(3): 420–428.

Quiroz A, Niemeyer HM, 1998. Olfactometer-assessed responses of aphid *Rhopalosiphum padi* to wheat and oat volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 24(1): 113–124.

Robertson HM, Martos R, Sears CR, Todres EZ, Walden KK, Nardi JB, 1999. Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae. *Insect Molecular Biology*, 8(4): 501–518.

Thorsteinson AJ, 1955. The experimental study of the chemotactic basis of host specificity in phytophagous insects. *Canadian Entomologist*, 87(2): 49–57.

Vandermoten S, Francis F, Haubruge E, Leal WS, 2011. Conserved odorant-binding proteins from aphids and eavesdropping predators. *Plos One*, 6(8): e23608.

Visser JH, Taanman JW, 1987. Odour-conditioned anemotaxis of apterous aphids (*Cryptomyzus korschelti*) in response to host plants. *Physiological Entomology*, 12(4): 473–479.

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24(5): 481–495.

Wang J, 2016. Identification and functional characterization of olfactory relative protein in *Chrysopa pallens*. Doctor dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [王娟, 2016. 大草蛉嗅觉相关蛋白基因的鉴定及功能研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]

Wu WJ, Hu ZN, Ji ZQ, 2021. Research and Application of Plant-derived Pesticides in China. Beijing: Chemical Industry Press. 101–119. [吴文君, 胡兆农, 姬志勤, 2021. 中国植物源农药研究与应用. 北京: 化学工业出版社. 101–119.]

Xie GA, 2021. Study on environmental behavior, biological activity and toxicity of broflanilide in paddy field. Doctor dissertation. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. [谢谷艾, 2021. 溴虫氟苯双酰胺的稻田环境行为、生物活性及毒性研究. 博士学位论文. 南昌: 江西农业大学.]

Yan L, Guo R, Li YJ, Li LL, Wei QR, Han YB, Liu MY, Ma XL, 2017. Study on morphological and biological characteristics of *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) on Chinese wolfberry (*Lycium barbarum*). *Acta Entomologica Sinica*, 60(6): 666–680.

[严林, 郭蕊, 李亚娟, 李琳琳, 卫琼如, 韩云帮, 刘梦瑶, 马秀莲, 2017. 枸杞棉蚜形态和生物学特性研究. 昆虫学报, 60(6): 666–680.]

Yang GQ, Wang Q, Zhang QL, Liu K, Ran HN, Ma YF, Dong SL, He P, 2021. Review of research on the olfactory genes of rice planthoppers. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 58(4): 783–794. [杨贵琴, 王琴, 张秋良, 刘坤, 冉会奴, 马云峰, 董双林, 贺鹏, 2021. 稻飞虱嗅觉相关基因及功能的研究进展. 应用昆虫学报, 58(4): 783–794.]

Zhang GH, Yang L, Xia G, Tian XL, Mao YN, 2023. Cloning and sequencing of the odor-binding protein gene *PstrOBP1* and its prokaryotic expression. *Journal of Southern Agricultural Sciences*, 54(7): 2015–2022. [张国辉, 杨岭, 夏根, 田晓丽, 毛永娜, 2023. 黄曲条跳甲气味结合蛋白基因 *PstrOBP1* 克隆测序及其原核表达. 南方农业学报, 54(7): 2015–2022.]

Zhang YR, 2021. Research on the development of manufacturing industry in western China under the perspective of global value chain. Doctor dissertation. Chengdu: Southwest University for Nationalities. [张玉荣, 2021. 全球价值链视域下中国西部民族地区制造业发展研究. 博士学位论文. 成都: 西南民族大学.]

Zhao W, 2022. Construction of olfactory gene database and virtual screening of OBPs modulators. Master dissertation. Guiyang: Guizhou University. [赵威, 2022. 嗅觉基因数据库的构建及 OBPs 调节剂的虚拟筛选. 硕士学位论文. 贵阳: 贵州大学.]

Zhong T, Yi J, Liu H, Wang JJ, Li KB, Wei YG, Cao YZ, 2008. Cloning and sequence analysis of common odor-binding protein genes in tentacles of *Loxostege sticticalis*. *Plant Protection*, 34(4): 31–36. [钟涛, 尹姣, 刘怀, 王进军, 李克斌, 韦永贵, 曹雅忠, 2008. 草地螟触角普通气味结合蛋白基因的克隆及序列分析. 植物保护, 34(4): 31–36.]

Zhou JJ, Vieira FG, He XL, Smadja C, Liu R, Rozas J, Field LM, 2010. Genome annotation and comparative analyses of the odorant-binding proteins and chemosensory proteins in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Insect Molecular Biology*, 19(Suppl. 2): 113–122.

Zhou JY, 2022. Biodiversity investigation and analysis of important agricultural cultural heritage systems. Master dissertation. Hangzhou: Zhejiang University. [周静怡, 2022. 重要农业文化遗产系统的生物多样性调查与分析. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学.]

Zhou YY, 2013. Comprehensive Development and Utilization of Medicinal and Food Homologous Traditional Chinese Medicine Resources. Harbin: North Literature and Art Publishing House. 279. [周媛媛, 2013. 药食同源中药资源的综合开发与利用. 哈尔滨: 北方文艺出版社. 279.]